

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-154616

(43)Date of publication of application : 18.06.1996

(51)Int.Cl.

A23L 1/20
C12N 1/20
// (C12N 1/20
C12R 1:125)

(21)Application number : 06-330885

(71)Applicant : KIKKOMAN CORP

(22)Date of filing : 09.12.1994

(72)Inventor : YAMAGUCHI NORIO
OGAWA YOSHIHIRO
YAMAZAKI EMIKO
YUASA KATSUMI

(54) QUALITY-IMPROVED NATTO AND NOVEL MUTANT STRAIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide NATTO (fermented soybean) improved in quality and useful in health because it has a reduced ammonia content lower than a prescribed value and contains more than a prescribed amount of L-polyglutamic acid.

CONSTITUTION: This quality-improved NATTO has less than 65mg% (W/W) ammonia content and more than 1,000mg%(W/W) L-polyglutamic acid. This modified NATTO is produced as follows: soybeans are soaked in water in a 5-time weight/weight(W/W) of the soybean at 10-20° C for 20 hours, drained, and treated with heat or an organic solvent to modify the soybean protein. Then, the modified soybean protein is adjusted in its temperature to 75-85° C, inoculated with the cell bodies of natto bacillus or its spores in an amount of $(0.8-1.2) \times 10^4$ cells/g of the boiled soybeans. Then, the inoculated soybeans are cultured under conditions of 35-40° C temperature and 85-95% humidity to give this NATTO. This modified natto bacillus is *Bacillus subtilis* MR141 (FERM- P-14692).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.10.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 21.08.2001

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-154616

(43)公開日 平成8年(1996)6月18日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 L 1/20	1 0 9 Z			
C 1 2 N 1/20		A 8828-4B		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:125)				

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平6-330885

(22)出願日 平成6年(1994)12月9日

(71)出願人 000004477

キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田339番地

(72)発明者 山口 典男

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

(72)発明者 小川 善弘

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

(72)発明者 山崎 恵美子

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 品質改良納豆および新規変異菌株

(57)【要約】

【目的】アンモニア含有量が少なく、かつガンマーポリグルタミン酸含有量が従来の納豆と変化ないか、それよりも多い品質改良納豆、その製造法、その製造に用いる納豆菌株の提供。

【構成】アンモニア含有量が65mg%(w/w)以下、ガンマーポリグルタミン酸含有量が1000mg%(w/w)以上である品質改良納豆。該納豆を製造し得る納豆菌株を使用することを特徴とする品質改良納豆の製造法であり、また該納豆菌が新規変異菌株バチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)MR141(工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号:FERMP-14692)である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アンモニア含有量が65mg% (w/w) 以下であり、かつガンマーポリグルタミン酸が1000mg% (w/w) 以上であることを特徴とする品質改良納豆。

【請求項2】 下記の方法で、培養して得られる培養物のアンモニア含有量が65mg% (w/w) 以下であり、かつガンマーポリグルタミン酸が1000mg% (w/w) 以上である培養物を製造し得る能力を有する納豆菌を用いることを特徴とする請求項1記載の培養物の製造法。

培養法： 豆類を、5倍量 (w/w) の水で、10～20℃で、20時間、浸漬し、水切りする。このものについて、加熱処理または有機溶剤処理して豆類の蛋白質を変性処理する。次にこの豆類の品温を75～85℃に調整し、納豆菌の細胞または胞子を(0.8～1.2)×10⁴個/蒸煮大豆gとなるように接種する。そして品温35～40℃、培養室内湿度85～95%、25時間で培養する。

【請求項3】 請求項2記載の培養物を製造し得る能力を有する新規変異菌株バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) MR141 (工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号：FERM P-14692)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は品質改良納豆、詳しくは、アンモニア含有量が少なく、かつガンマーポリグルタミン酸 (以下、PGAという) 含有量が従来のものと変らないか、それよりも多い品質改良納豆、およびその納豆を製造するに際し使用する納豆菌および新規変異菌株に関する。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質変性処理した豆類を培地として納豆菌を培養ないし発酵した納豆などの培養物は健康によい食品であるが、それを嫌う人も多い。それはアンモニア臭がするからである。それを改良するために種々の方法が提案されている。すなわち、①製造した納豆からアンモニアがあまり遊離しないものを製造し得る新規納豆菌株バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) TTCC162 (微工研寄託第11052号) を用いる方法 (特開平4-173069号公報)、②生育が低温感受性である新規変異菌株K-2 (*Bacillus* sp. K-2) (微工研寄託第9768号) を用いて、納豆の二次発酵を抑える方法 (特公平5-60335号公報)、③蕎麦粉、小麦胚芽、大麦などを大豆原料に添加する方法 (特開昭56-154964号公報、特公昭60-36735号公報) などである。

【0003】 しかしながら、前記①の方法は、納豆のp

Hを変化させることによって納豆からのアンモニア遊離を抑制すること、また②は、保存中の納豆菌生育を温度で制御することによってアンモニア生産を抑制すること、だけであり、納豆製造中のアンモニア生産を本質的に抑えていないので、納豆中のアンモニア含有量は従来のものと大差ない。その結果、どうしても室温での長期間の保存 (例えば、8日以上) において、アンモニア生産が200mg% (w/w) 以上になってしまい、不快なアンモニア臭を感じさせることとなる。また③は大豆原料にそれ以外のものを添加するために本来の納豆とは異なった品質のものになる。それで、上記問題は本質的に解決されていないのが現状である。所で、納豆製造中に納豆菌の生育を極度に抑えれば、アンモニア含有量の少ない納豆は製造できる。しかし出来た納豆は納豆菌の生育が少ないので、納豆菌の生育と大豆蛋白質の分解に伴って生成するPGAの含有量 (納豆菌生育量の指標のひとつである) が少なくなる。その結果、蒸煮大豆臭の強い、納豆特有の香味と糸引き性のない低品質のものになってしまう。そこに高品質納豆製造のむずかしさが

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、前記問題を解決するためになされたもので、従来の納豆と比較して、アンモニア含有量が少なく、かつPGA含有量が従来のものと変らないか、それよりも多い品質改良納豆の提供、またその製造を可能にする納豆菌および新規変異菌株を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究した結果、アンモニア生産能力がより低く、かつPGA生産能力が従来知られている納豆菌株のものと変らないか、それより高い特定の納豆菌株を分離して、納豆製造に用いると前記課題が解決できるとの知見に基づいて、本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明は、アンモニア含有量が65mg% (w/w) 以下であり、かつPGAが1000mg% (w/w) 以上である品質改良納豆であり、およびこのような納豆を製造するにあたり、特定の納豆菌を使用する品質改良納豆の製造法である。また特定の納豆菌が新規変異菌株バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) MR141 (工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号：FERM P-14692) に関する。

【0007】 以下、本発明を詳細に説明する。

(測定法) 本発明においては、アンモニア、およびPGAの測定法は、以下のものである。

アンモニア (mg%) : 納豆ないし培養物50gに水100mlを加え、十分にかきまぜた後、ガーゼで固形物を除去する。次いで、この濾液を遠心分離して得た上清液をメンブランフィルター (0.45μm) を用いて除

菌し、試料液とする。該液について、HPLCによる自動アミノ酸分析法と同様に測定する。

PGA (mg %) : 前記と同様にして得た試料液をSDS-ポリアクリルアミド板上に乗せ、電気泳動を行なった後、該板をアルシアンブルーで染色し、染色されたPGAのバンドの色度をデンストメトリーで測定する。

【0008】本発明でいう納豆とは、公知の通常の納豆製造法を用いて、豆類の蛋白質を変性処理し、その豆類に納豆菌を培養して得られる培養物または発酵物と定義される。そして、例えば次のような方法によって得られる。

納豆菌の培養（発酵）法；豆類を、2～7倍量（w/w）、好ましくは4～6倍（w/w）の水で、5～40℃、好ましくは10～20℃で、10～30時間、好ましくは15～25時間、浸漬し、水切りする。このものについて蛋白質変性処理をする。次に変性処理した豆類の水分を50～70%（w/w）、好ましくは55～65%（w/w）、品温を60～90℃、好ましくは75～85℃に調整し、納豆菌の細胞または胞子を（0.5～3）×10⁴個/蒸煮大豆g、好ましくは（0.8～1.2）×10⁴個/蒸煮大豆gとなるように接種する。そして品温15～45℃、好ましくは35～40℃、発酵室内湿度70～100%、好ましくは85～95%、10～40時間、好ましくは20～30時間で培養する。必要により、2～10℃、30～50時間熟成する。

【0009】前記方法において、豆類としては、例えば、大豆、黒豆、小豆、グリーンピース、うずら豆、空豆、いんげん豆、トウロクسن、ピーナツなどを挙げることができる。変性処理としては、例えば、加熱処理（蒸煮（例えば、1.6～2.0kg/cm²、30～60分）、焼いてからの蒸煮、油で揚げたからの蒸煮、過熱水蒸気などによる変性処理など）、アルコールなどの有機溶剤処理などを挙げることができる。前記ようにして得られる納豆は、公知の納豆菌を用いた場合、培養が終了した時点で、通常、アンモニア含有量が70～200mg%（w/w）、PGA含有量が1000～1400mg%（w/w）である。

【0010】本発明の納豆菌株とは、下記の方法で、培養して得られる培養物のアンモニア含有量が65mg%（w/w）以下であり、かつガンマーポリグルタミン酸が1000mg%（w/w）以上である培養物を製造し得る能力を有する納豆菌と定義される。そしてそれらの含有量は、培養が終了した時点での含有量であり、長期間保存したものについてのものではない。

培養法：豆類を、5倍量（w/w）の水で、10～20℃で、20時間、浸漬し、水切りする。このものについて、加熱処理または有機溶剤処理して豆類の蛋白質を変性処理する。次にこの豆類の品温を75～85℃に調整し、納豆菌の細胞または胞子を（0.8～1.2）×

10⁴個/蒸煮大豆gとなるように接種する。そして品温35～40℃、培養室内湿度85～95%、25時間で培養する。

【0011】本発明の特徴は、前記のようにして得られる納豆のアンモニア含有量を65mg%（w/w）以下、好ましくは60mg%（w/w）以下、より好ましくは50%（w/w）以下、最も好ましくは40%（w/w）以下、かつPGAを1000mg%（w/w）以上、好ましくは1600mg%（w/w）以上、特に好ましくは、2100mg%（w/w）以上にした品質改良納豆である。そして、それを製造する際に、本発明の納豆菌株を使用することにある。このような菌株は自然界から分離してもよいが、市販されている納豆菌を親株として、それに変異処理を施して、新規変異菌株として分離する方が好適である。

【0012】なお、納豆のアンモニア含有量が65mg%（w/w）を超える場合は、保存中にアンモニアが増加して200mg%（w/w）を超えるようになり、アンモニア臭が感じられるようになる。またPGAが1000mg%（w/w）未満の場合は、納豆菌が納豆に十分に生育していないことを示すものであるので、プロテアーゼの生産量も少ない。それで、そのような納豆は蒸煮大豆臭がつよく、納豆特有の香気と味が非常に少なくなる。また、PGAに基づく納豆の糸引き性も少ない。それで全体として低品質納豆になる。すなわち、納豆中のPGA含有量は納豆菌の生育量を推量する一つの指標であるからである。

【0013】前記新規変異菌株を得るために使用する納豆菌親株としては、バチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）に属し、ビオチン（biotin）要求性を有する公知の納豆菌が使用できる。その具体例としては、宮城野納豆菌、高橋菌、旭川菌、松村菌、成瀬菌などの市販されているものを挙げることができる。

【0014】前記変異処理法としては、通常公知の方法、例えば、遺伝子操作による法、細胞または胞子に、変異源性のある薬剤を接触させる法、またX線、紫外線、放射線、光などを照射する法、を挙げることができる。本発明においては、変異源性のある薬剤を用いる方法が好適に採用できる。該薬剤としては、公知のもの、例えば、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）、メチルエチル硫酸を挙げることができる。そして、これらの薬剤を納豆菌の細胞または胞子に接触させる際、通常、その薬剤濃度は、細胞10⁸～10⁹個/mlの細胞懸濁液において、10～1000γ/mlである。また接触は、通常、0～50℃で、10～1400分である。

【0015】変異処理された細胞または胞子は、通常の公知の栄養培地、例えば、肉汁、ペプトン、大豆粉、酵母エキス、カザミノ酸、アミノ酸類またはそれらの混合

物などが含有する培地、または必要な栄養素類を含有する無機合成培地などの液体培地で3～24時間培養する。その後、適当に希釈されて、それらの培地の寒天平板に塗抹する。また前記変異処理した細胞または胞子をこれらの平板培地に直接に塗抹してもよい。そして培養後、平板培地に出現するコロニーを一つ一つ肉汁などが含有する寒天斜面培地にとり、培養する。それらの培養菌株を、前記定義の納豆菌株培養法に基づいて、各々培養してみる。そして、各々の培養物について、アンモニア含有量、PGA含有量を測定する。かくして、アンモニア含有量が65mg% (w/w) 以下で、PGA含有量が1000% (w/w) 以上である培養物を製造し得る能力を有する納豆菌株が本発明の新規変異菌株として分離される。このような分離法は無差別スクリーニング法と云われる。

【0016】また、本発明においては、前記の無差別スクリーニング法の他に、本発明の納豆菌株を、新規変異菌株として、選択的に濃縮して分離する方法が好適に利用できる。例えば次のような方法を挙げることができる。変異処理した細胞または胞子を前記の液体培地で培養し、得られた細胞を唯一窒素源として一種または複数のアミノ酸類を添加した培地に懸たくし、目的の変異菌株細胞（例えば、アミノ酸からアンモニアを生産しない株）だけを濃縮する公知の濃縮法、例えば、ペニシリン濃縮法などの操作をする。該アミノ酸としては、例えば、アルギニン、アスパラギンなどの塩基性のものが好適に用いられる。

【0017】次に、前記の栄養平板培地表面にメンブランフィルターを載せ、該メンブランフィルター上に濃縮処理した細胞懸たく液を塗抹する。該面上にコロニーが形成されたら、メンブランフィルターをはがし、pH調整用平板培地、例えば、1～100mMのマレイン酸-NaOH緩衝液、0.8～2.5% (w/v) 寒天、pH5～7などの組成の平板培地に移す。そして0.1～

1時間放置する。この操作により該メンブランフィルターのpHが5～7になる。次に、該メンブランフィルターはアッセイ平板培地、例えば、1～100mMのアミノ酸、pH5～7、0.8～2.5% (w/v) 寒天、0.001～0.01% (w/v) ブロムクレゾールパープル (BCP; bromcresol purple、pH指示薬) などの組成の平板培地に移す。そして25～45℃で0.1～5時間インキュベートする。その際、L-アルギニンを分解し、アンモニアをより多く生成するコロニー（親株、アンモニア生産能力の高い菌株、また親株の性質があまり変化しない菌株のコロニー）は、その周囲のpHが上昇するので、コロニーの周囲のメンブランフィルターが青色に変色する。しかし、アンモニア生産能力の低い変異菌株のコロニー周辺は変色せず黄色のままである。

【0018】コロニー周辺が黄色である変異菌株だけを多数分離して、その各々について、前記無差別スクリーニング法と同様に培養物を製造してみる。そして、前記定義の培養物を製造し得る納豆菌株が、本発明の納豆菌株であり、かつ新規変異菌株である。なお、自然界から本発明の納豆菌株を分離する場合も前記二つのスクリーニング法が好適に用いられることは言うまでもない。

【0019】前記の方法では、多数の新規変異菌株が分離できるが、一例として、MR141、MR131（以下、これらの株を単にMR141、MR131という）を挙げることができる。MR141、MR131は、親株として宮城野納豆菌株 (*Bacillus subtilis*)（以下、単にMR-1いう）を用いて、得られたものである。

【0020】MR141の菌学的性質をMR-1のものと比較した結果を表1に示す。なお、菌学的性質を調べる実験は、「微生物の同定法」（衛生技術会刊行、1983年）に記載されている方法に従った。

【0021】

表1 MR141とMR-1の菌学的性質の比較

性質	MR-1	MR141
1) 栄養細胞の形態	桿菌	桿菌
2) 胞子の形成	陽性	陽性
3) グラム染色	陽性	陽性
4) 酸素要求性	偏性好気	偏性好気
5) 澱粉分解性	陽性	陽性
6) グルコースからの 酸生成	陽性	陽性
7) 硝酸塩の還元	陽性	陽性
8) カタラーゼ	陽性	陽性
9) アセトインの生成	陽性	陽性
10) 7%食塩含有培地 での生育	陽性	陽性

【0022】上記以外の性質、例えば、ビオチン要求性、細胞の大きさ ($1 \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$)、胞子の大きさ ($0.8 \times 1.6 \sim 1.8 \mu\text{m}$)、肉汁寒天培地での生育状態 (25°C で25時間培養)、ゼラチン穿刺培養の生育状態、リトマスミルクでの生育状態およびリトマス還元性、各種糖類からの酸の生成、生育適温範囲、DNAのGC含量、などの性質についても実験を行なったが、それらの性質はMR-1と一致した。よって、MR141はバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) に属することは明らかである。

【0023】しかし、MR141を前記定義の納豆菌株培養法で培養したとき、培養物のアンモニア含有量が $65\text{mg}\%$ (w/w) 以下で、MR-1のものの $1/2 \sim 1/3$ であり、PGA含有量は、MR-1のものより、 $1.8 \sim 3.5$ 倍も高い。またMR141の納豆のプロテアーゼ活性は、MR-1に較べて2~3倍強い。以上の特質を有しているMR141を用いると、アンモニア含有量が $65\text{mg}\%$ (w/w) 以下で、かつPGA含有量が $1000\text{mg}\%$ (w/w) 以上である納豆を製造できる。また、前記のようにプロテアーゼ生産性が高いので製造された納豆は、蛋白質はよく分解されている。それで香味が優れている。このようなものは親株MR-1では到底製造できない。この点がMR141とMR-1との明確な相違点である。MR131についてもMR141と同様な実験を行なって、その性質を調べたが、それはMR141と同様であった。

【0024】前記のような方法で納豆菌を培養をして納豆を製造するとき、アンモニア含有量が最も少ないものを製造できる公知の納豆菌株としては、その含有量が $70\text{mg}\%$ (w/w) である *Bacillus* sp. K-2 (微工研寄託第9768号) (特公平5-60335号公報) (食品と開発、第23巻、No. 8、47~47頁、1988年) をあげることができるだけである。またPGA含有量と相関関係にある粘度の高い納豆を製造し得る菌株としては、親株の $1.6 \sim 1.7$ 倍高いものを製造し得るバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) TTCC162 (微工研寄託第11052号) (特開平4-173069号公報) を挙げることができるが、そのアンモニア含有量は $95\text{mg}\%$ (w/w) である。このように、アンモニア含有量が $65\text{mg}\%$ (w/w) 以下で、かつPGA含有量が $1000\text{mg}\%$ (w/w) 以上である納豆を製造できる納豆菌または納豆菌変異菌株は現在まで、全く知られていない。よってバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) MR141、MR131を新規変異菌株と認定した。特にMR141を工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMP-14692なる受託番号で寄託している。

【0025】前記のようにして得られる本発明の納豆菌

株およびMR141は、前記のような特質を供えているので、それらを用いることによりアンモニア含有量が $65\text{mg}\%$ (w/w) 以下で、かつPGA含有量が $1000\text{mg}\%$ (w/w) 以上である納豆を容易に製造できる。なお、本発明の納豆菌株およびMR141は本発明の納豆の製造以外にも、固体培養、液体培養などを行なって、例えばPGA、PGA合成酵素であるガンマーグルタミルトランスベプチダーゼ ($\gamma\text{-glutamyl transpeptidase}$; $\gamma\text{-GTPase}$)、プロテアーゼの生産など、その他該菌の特性を生かすことのできるもの、例えば、蛋白質の分解物 (ペプチド、アミノ酸)、調味料の製造に好適に使用できる。

【0026】

【発明の効果】本発明の納豆は、従来の納豆に較べて、アンモニア含有量が少なく、かつPGA含有量も従来の納豆と変化する、それより多い。また、長期間保存してもアンモニア含有量の増加量が従来のものに較べて格段に低いので、アンモニア臭がするようにはならない。すなわち、品質が劣化することがない。更に納豆菌が十分に生育した納豆であるので、プロテアーゼ生産量も十分であり、大豆蛋白質がよく分解されている。その結果として、香味が優れた高品質の品質改良納豆になる。このような納豆は本発明の納豆菌株および新規変異菌株MR141を用いることにより初めて可能になる。それは、それらの菌株がアンモニア生産能力が従来知られている納豆菌よりも低いからである。また、それらの菌株は納豆の製造以外にも、固体培養、液体培養などを行なって、例えばPGA、 $\gamma\text{-GTPase}$ 、プロテアーゼなどの生産、その他該菌の特性を生かすことのできるもの、例えば、蛋白質の分解物 (ペプチド、アミノ酸)、調味料の製造に用いることができる。

【0027】

【実施例】以下本発明を実施例をもって説明する。

実施例1

(変異) MR-1の胞子懸濁液 (10^6 個/ ml) を調製し、 65°C で30分間ヒートショックをかけた。これを、前培養培地 (1.0% 肉エキス、 0.3% 酵母エキス、 $\text{pH}7.2$) 40ml を入れた 150ml 容ひだ付三角フラスコに、培地量の 100 分の 1 容量接種した。次に 37°C で8時間、 120rpm で振盪培養した。この培養液にNTGを終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、更に16時間培養した。遠心分離で菌体を集め、殺菌した生理食塩水で洗浄し、次に、同食塩水で 2×10^4 倍に希釈した。

【0028】(スクリーニング) 上記の希釈液 $100\mu\text{l}$ を 5% 大豆粉、 1.5% 寒天平板培地上にメンブレンフィルター (アドバンテック東洋、孔径 $0.45\mu\text{m}$ 、ニトロセルロースメンブレンフィルター) を介して塗抹した。 37°C で20時間培養後、コロニーが形成したメ

ンブレンフィルターをpH調整用寒天平板培地(10mMマレイン酸-NaOH緩衝液、1.5%寒天、pH5.3)上に移し、室温で30分放置し、メンブレンフィルターのpHを平衡化させた。次にアッセイ用平板培地{10mML-アルギニン(L-arginine)、0.005%BCP、pH5.3}上に移し37℃で2時間インキュベートした。コロニー周辺の色が変化しない菌株を釣り上げ生理食塩水1mlに懸濁した。この懸濁液を再度上記同様のスクリーニング操作をすることにより変異菌株の純化を行なって、本発明の新規変異菌株として斜面培地(Difco、nutrient agar)に保存した。

【0029】(納豆の製造)米國小粒丸豆を5倍容の水道水(15℃)で20時間浸漬した。これを蒸煮釜に入れ、初めに、無圧で10分、次に1.8kg/cm²で40分蒸煮した。蒸気を止めてから10分保持した後、徐々に減圧してから取り出した。直後、80℃の蒸煮大豆に、前記保存新規変異菌株の孢子懸濁液(前記保存斜面培地から1白金耳の孢子を取り、200mlの1%殺菌食塩水に懸濁することにより調製した)を孢子10⁴個/蒸煮大豆gとなるように接種し、納豆製造用スチロール容器(50g容)に50gあて充填した。発酵は品温37℃、培養室内湿度90%で、20時間行った。

【0030】各新規変異菌株で製造した納豆について、アンモニア、およびPGAの含有量を測定した。また官能検査で香味を調べ、アンモニア含有量が65mg%

(w/w)以下で、かつPGA含有量が1000mg%(w/w)以上である、香味豊富な品質改良納豆をつくる新規変異菌株を多数分離した。これらの新規変異菌株の代表として、MR141、MR131を選んだ。特にMR141については工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-14692なる受託番号で寄託した。

【0031】実施例2

本発明の新規変異菌株MR141、MR131およびその親株であるMR-1を用いて、前記の方法で各々の納豆を製造し、納豆の品質(アンモニア含有量、PGA含有量、香味、プロテアーゼ活性)を調べ、比較した。なお、香味の官能試験は訓練された20名のパネラーに納豆を試食させ、どちらが好ましいかを問い、好ましいと答えた人数で表現した。またプロテアーゼ活性は以下の方法により測定した。

プロテアーゼ活性(PU/g)測定:納豆50gに水100mlを加え、十分にかきまぜた後、ガーゼで固形物を除去した。次いで、この濾液を遠心分離して得た上清液をメンブレンフィルター(0.45μm)を用いて徐菌し、酵素液とした。これにつき、アンソン-荻原変法(Y. Fukushima; Agric. Biol. Chem., 49巻、1643頁、1985年)に従って、測定した。

【0032】

表2

菌株	アンモニア含有量 mg % (w/w)	PGA含有量 mg % (w/w)	プロテアーゼ活性 (PU/g)	香味 (人数)
MR141	30	2200	140	18
MR131	40	1400	130	16
MR-1	80	1000	95	2

表2から分るように、本発明の新規変異菌株MR141、MR131で製造した本発明の納豆はアンモニア含有量が各々30および40mg%(w/w)でMR-1の納豆もの80mg%(w/w)より、各々、約1/3、1/2と低い。納豆菌生育量の指標の一つであるPGA含有量も各々2200mg%(w/w)、1400mg%(w/w)で親株MR-1のもの較べて、各々2.2倍、1.4倍と高い。それで、製造した納豆において納豆菌が十分に生育していることが分る。また、プロテアーゼ活性も親株のものより各々1.5倍、1.4

倍も高いので、納豆中の大豆蛋白質はよく分解されていた。香味の官能試験の結果も親株のものより格段よい。このようなことから本発明の納豆は香味の優れた品質改良納豆であることが分る。

【0033】実施例3

実施例2で得られた納豆について、室温(27~30℃)で保存試験を行ない納豆のアンモニアを測定した。そしてアンモニアの増加量を表3に示した。

【0034】

表3

アンモニア含有量の増加量 mg % (w/w)		
保存日数	MR141	MR-1

1	8. 3	19. 5
2	18. 2	37. 2
5	44. 6	141. 7
10	83. 4	240. 1

【0035】表3から分るように、本発明の納豆は室温で保存しても、MR-1のものに較べてアンモニアの含有量の増加量は格段に少ない。

フロントページの続き

(72) 発明者 湯浅 克己
千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
株式会社内